

Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes.

著者	吉林 護
学位授与機関	滋賀医科大学
学位授与年度	令和2年度
学位授与番号	14202甲第876号
発行年	2020-09-09
URL	http://hdl.handle.net/10422/00012845

doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.088(<https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.02.088>)

氏 名 吉林 護

学 位 の 種 類 博士 (医学)

学 位 記 番 号 博士甲第 876 号

学 位 授 与 の 要 件 学位規則第 4 条第 1 項

学 位 授 与 年 月 日 令和 2 年 9 月 9 日

学 位 論 文 題 目 Protective role of podocyte autophagy against glomerular
endothelial dysfunction in diabetes

(糖尿病による糸球体血管内皮障害に対する、ポドサイトオートファジーの保護的役割)

審 査 委 員 主査 教授 河内 明宏

副査 教授 丸尾 良浩

副査 教授 鈴木 友彰

論文内容要旨

※整理番号	886	氏名	吉林 護
学位論文題目	Protective role of podocyte autophagy against glomerular endothelial dysfunction in diabetes (糖尿病による糸球体血管内皮障害に対する、ポドサイトオートファジーの保護的役割)		
<p>【目的】</p> <p>糖尿病性腎症は、糸球体血管内皮障害による微量アルブミン尿の出現に始まり、糸球体上皮細胞（ポドサイト）障害による難治性高度蛋白尿を経て、末期腎不全へ至る疾患である。糖尿病におけるポドサイト障害には、ポドサイトオートファジー不全の関与が報告されている。オートファジーは細胞障害ストレスに対して細胞保護に働く恒常性維持機構の一つであり、ポドサイトでは他の細胞に比べてオートファジー活性が高いことが知られている。糖尿病性腎症における糸球体血管内皮障害とオートファジー不全に関連したポドサイト障害との関係は明らかになっておらず、本研究では、糖尿病で惹起される糸球体血管内皮障害と、ポドサイトオートファジー不全の関係について検討した。</p> <p>【方法】</p> <p>① 高脂肪食 (High fat diet: HFD) 負荷肥満 2 型糖尿病モデルにおける糸球体血管内皮障害の表現型の検討 8 週齢 C57BLK/6J マウスに HFD 負荷を 32 週間行い、糸球体血管内皮細胞の機能的障害を尿中一酸化窒素排泄量で評価し、構造的障害を走査電子顕微鏡・蛍光染色を用いて評価した。</p> <p>② 糸球体血管内皮障害とポドサイトオートファジー不全の関係性についての検討 オートファジー活性化に必須である Atg5 遺伝子の flox マウス (Atg5-flox) とタモキシフェン (TM) 誘導性ポドサイト特異的 Cre 発現マウスを交配し、TM 誘導性ポドサイト特異的オートファジー不全マウス (iPodo-Atg5^{-/-}) を作成した。これらマウスに HFD 負荷、血管内皮型一酸化窒素合成酵素(NOS3^{-/-})欠損マウス (全身) との交配 (NOS3^{-/-}+iPodo-Atg5^{-/-})、血管内皮グリコカリックスの消失をもたらすノイラミニダーゼの尾静脈投与を用い、アルブミン尿の程度、糸球体血管内皮障害とポドサイト障害の空間的関連について検討した。</p> <p>③ 糸球体血管内皮障害に伴うオートファジー不全ポドサイト細胞の障害機序の検討および治療標的の同定 オートファジー誘導に必要となる Atg7 遺伝子をノックアウトしたマウスポドサイト細胞 (Atg7^{-/-}) および野生型ポドサイト細胞 (Atg7^{+/+}) を、ウシ血清アルブミン (5g/dl) に 30 時間共孵置培養した。これら細胞をプロテオーム解析に供し、蛋白発現の比較検討およびパスイ解析を行った。これらの結果から、オートファジー不全ポドサイト細胞障害に小胞体 (ER) ストレスの関与が示唆されたため、ER ストレス軽減薬 (タウロウルソデオキシコール酸) の抗蛋白尿効果をノイラミニダーゼ投与 iPodoAtg5^{-/-}マウスを用いて検討した。</p>			

(備考) 1. 論文内容要旨は、研究の目的・方法・結果・考察・結論の順に記載し、2 千字程度でタイプ等を用いて印字すること。

2. ※印の欄には記入しないこと。

【結果】

① HFD4 負荷 4 週目より尿中一酸化窒素排泄の減少が確認され、8 週目より免疫染色にて糸球体血管内皮グリコカリックスの減少、走査電子顕微鏡にて糸球体血管内皮の有窓構造消失が確認された。これら所見は HFD32 週目まで観察された。

② 8 週間の HFD 負荷を行った *Atg5^{-flox}* (コントロールマウス) および *iPodoAtg5^{-/-}* マウスに TM を投与すると、*Atg5^{-flox}* マウスに比べ *iPodoAtg5^{-/-}* マウスで有意なアルブミン排泄量増加を認めた。走査電子顕微鏡を用いた検討では、*Atg5^{-flox}* マウスならびに *iPodoAtg5^{-/-}* マウスともに、糸球体血管内皮の有窓構造消失が部分的に認められた。しかし、*Atg5^{-flox}* マウスでは糸球体血管内皮障害の有無に関わらず、ポドサイトの形態は保たれていたが、*iPodoAtg5^{-/-}* マウスでは、有窓構造が保たれている非障害内皮に隣接したポドサイトではその形態は保たれていたものの、障害内皮に隣接したポドサイトでは足突起構造の破綻を認めた。通常食飼育下ノイラミニダーゼ投与モデルでも、*iPodoAtg5^{-/-}* マウスでアルブミン排泄量増加、ポドサイト足突起構造の破綻が認められた。*NOS3^{-/-}* *iPodoAtg5^{-/-}* マウスでは、ポドサイト形態は正常に保たれていた。

③ アルブミンで共孵置培養した *Atg7^{-/-}* 細胞では、*Atg7^{-/-}* 細胞に比べアポトーシスを示唆する cleaved Capase3 蛋白の発現が有意に増加しており、アポトーシスに至るパスウェイ解析では、ER ストレスに関連する蛋白発現が増加していた。タウロウルソデオキシコール酸を腹腔内投与したノイラミニダーゼ投与 *iPodoAtg5^{-/-}* マウスでは、ポドサイトでの ER ストレス軽減とともに、アルブミン尿の減少が認められた。

【考察】

ポドサイトにおけるオートファジーは、糸球体血管内皮の構造障害に伴うアルブミン漏出増加によって惹起されるポドサイト ER ストレス亢進を軽減させ、ポドサイトを保護することが示された。以上の結果より、糸球体血管内皮を保護すると共に、ポドサイトのオートファジーを活性化させ ER ストレスを軽減することが新たな糖尿病性腎症の治療戦略となる可能性がある。

【結論】

糖尿病による糸球体血管内皮の構造障害に伴うアルブミン漏出増加に対して、ポドサイトオートファジーがポドサイト保護に働くことが示された。

学位論文審査の結果の要旨

整理番号	886	氏 名	吉 林 護
論文審査委員			
<p>（学位論文審査の結果の要旨）※明朝体 11 ポイント、600 字以内で作成のこと</p> <p>本論文は、糖尿病による糸球体血管内皮障害に対する、ポドサイトオートファジーの保護的役割をマウスを用いて検討し、以下の点を明らかにした。</p> <p>1) マウスに高脂肪食を負荷することによって、糸球体血管内皮細胞の構造的障害である有窓構造崩壊とグリコカリックスの消失が認められた。</p> <p>2) 後天的ポドサイト特異的オートファジー不全マウスでは、高脂肪食負荷によってアルブミン尿の増悪やポドサイト障害が認められ、ポドサイト障害は障害血管内皮に隣接しているポドサイトのみで認められた。</p> <p>3) 糖尿病状態で惹起される糸球体血管内皮の構造的異常に対して、オートファジーはポドサイト保護的に働き、その機能不全が高度タンパク尿の原因となることが推測された。</p> <p>4) オートファジー不全ポドサイトでは、アルブミンの負荷によって ER ストレスが亢進し、アポトーシスが惹起される可能性が示唆された。</p> <p>5) ER ストレス軽減薬投与によって、ポドサイト保護作用、アルブミン尿の改善が認められた。</p> <p>本論文は、糖尿病による糸球体血管内皮の構造障害に伴うアルブミン漏出増加に対して、ポドサイトオートファジーがポドサイト保護に働くことを示したもので、本領域の研究に新たな知見を与えたものであり、また最終試験として論文内容に関連した試問を実施したところ合格と判断されたので、博士（医学）の学位論文に値するものと認められた。</p> <p style="text-align: right;">（総字数 572 字） （令和 2 年 8 月 24 日）</p>			